



NCAM- and FGF-2-mediated FGFR1 signaling in the tumor microenvironment of esophageal cancer regulates the survival and migration of tumor-associated macrophages and cancer cells

Takase, Nobuhisa

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2016-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6719号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006719>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



学位論文の内容要旨

NCAM- and FGF-2-mediated FGFR1 signaling in the tumor microenvironment of esophageal cancer regulates the survival and migration of tumor-associated macrophages and cancer cells

食道癌微小環境における NCAM/FGF-2 を介した FGFR1 シグナルは、
腫瘍関連マクロファージおよび癌細胞の生存・遊走を制御する

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
食道胃腸外科学

(指導教員：横崎 宏 教授)

(指導教員：掛地 吉弘 教授)

高瀬 信尚

背景と目的

腫瘍微小環境における主要な構成要素の 1 つであるマクロファージ (MΦ) は、腫瘍抑制的に作用する M1 型と腫瘍促進的に作用する M2 型に分けられ、腫瘍関連マクロファージ tumor-associated macrophages (TAMs) は、主に M2 型に分化している。一般に M2 MΦ は IL-10^{high}、IL-12^{low} の表現型を示すとともに、ヘモグロビンスカベンジャー受容体である CD163 や、クラス A スカベンジャー受容体である CD204 を高発現し、M2 MΦ の浸潤は患者の不良な予後と相関することがさまざまな腫瘍で報告されている。

近年の食道癌に対する疫学的研究において、腺癌が増加傾向であることが示されたが、日本を含むアジア諸国では依然大部分を扁平上皮癌が占めている。先行研究として、食道扁平上皮癌 (ESCC) 組織中に CD204 陽性 MΦ を多く含む症例は、不良な病理学的因子や予後因子と有意な相関を示すとともに、*in vitro* においても、ヒト末梢血単球より作成した MΦ 様細胞にヒト食道扁平上皮癌細胞株の培養上清 conditioned medium of the TE series human ESCC cell line (TECM) を作用させ作成した TAM 様細胞で、IL-10・CD163・CD204・VEGFA・MMP2・MMP9 のような M2 MΦ マーカーが有意に誘導されることを明らかにしている。

ESCC における TAM の役割をさらに解明するため、cDNA マイクロアレイを用いて、MΦ 様細胞から TAM 様細胞へ分化させることで誘導される遺伝子を網羅的に解析し、本研究では接着因子である NCAM (*neural cell adhesion molecule*) に着目した。NCAM は免疫グロブリンスーパーファミリーの 1 つで、神経系でのホモ親和性およびヘテロ親和性相互作用を介した軸索突起生成および細胞内癒着に関与することが知られている。NCAM は単球を含むさまざまな非神経性細胞でも発現するとともに、その発現は癌の進行にも関与することが報告されているが、TAM における NCAM の役割は依然として明らかとされていない。本研究では ESCC 微小環境における TAM での NCAM 発現の役割、および関連遺伝子 FGFR1 との相互作用を含めて解析した。

材料と方法

3 種のヒト食道扁平上皮癌細胞株 (TE-8, TE-9, TE-15) と、ヒト末梢血由来 CD14 陽性単球を使用した。TECM は、5×10⁶ 個ずつ 10cm ディッシュに播種し、24 時間後に 10% human AB serum を添加した培地に交換し、2 日後に回収した。CD14 陽性単球は健常成人ヒト末梢血ドナーから autoMACS Pro Separator を用いて単離した。CD14 陽性単球を MΦ コロニー刺激因子 (25 ng/mL) で 6 日間刺激することで MΦ 様細胞を作成し、MΦ 様細胞に 50% TECM を 48 時間作用させることで TAM 様細胞を作成した。cDNA マイクロアレイから得られた TAM 様細胞への分化で発現誘導が確認された接着遺伝子 NCAM の発現確認および機能解析を PCR 法・ウェスタンブロット法・免疫蛍光抗体法・細胞遊走アッセイ・細胞生

存アッセイを用いて確認するとともに、NCAM の関連遺伝子についても同様に解析した。

さらに神戸大学医学部附属病院において、外科的に切除された ESCC 70 例を用いた免疫組織化学的解析を行い、着目した遺伝子の発現強度による主要な臨床病理学的因子・MΦ マーカー・予後との相関性について検討した。統計学的評価にはカイ二乗検定、*t*-test を用い、 $P < 0.05$ を統計学的有意差とした。

結果

1. TECM の刺激による TAM 様細胞への分化により NCAM の誘導ならびに遊走・生存が促進される。

cDNA マイクロアレイ解析の妥当性を証明するため、PCR 法・ウエスタンブロット法・蛍光抗体法を用いて、TAM 様細胞における NCAM の有意な発現誘導を確認した。また二重蛍光免疫染色によって、葉状仮足の箇所ではファロイジンと NCAM が共局在し、NCAM が細胞運動能に関与する可能性が示唆された。これらの表現型解析では、TAM 様細胞に分化することによる PI3K-Akt を介した遊走・生存の有意な促進が確認された。

2. NCAM は PI3K-Akt シグナルを介した TAM 様細胞の生存・遊走に関与する。

siRNA を用いて TE-9 の TECM を作用させた TAM 様細胞の NCAM 発現をノックダウンし、細胞遊走能・細胞生存能の変化と、リン酸化チロシンキナーゼ抗体アレイによる解析を行った。NCAM をノックダウンした TAM 様細胞では、PI3K-Akt-p70S6K のリン酸化減弱を伴う有意な生存・遊走の低下が認められた。

3. TAM 様細胞における NCAM/FGF-2 を介した FGFR1 シグナルは FGFR1 のリン酸化を制御する。

TAM における NCAM と FGFR1 の相互作用について解析を行った。TE-9 の TECM を作用させた TAM 様細胞は、二重蛍光免疫染色によって NCAM と FGFR1 の共局在所見を呈した。ウエスタンブロット解析では、TAM 様細胞の NCAM 発現をノックダウンすることで FGFR1 のリン酸化が減弱した。興味深いことに、MΦ 様細胞から TAM 様細胞への分化によっても FGFR1 の発現およびリン酸化が亢進した。

さらに癌微小環境における FGFR1 の役割を解析するため、その主要なリガンドである FGF-2 との関連についても解析した。まずウエスタンブロット解析によって TAM 様細胞での FGF2 発現を確認するとともに、ELISA 法によって TE での FGF-2 分泌が認められたため、TAM 様細胞における FGF-2 の傍分泌作用による FGFR1 シグナルの影響を検討した。24 時間血清飢餓とした TAM 様細胞にヒト組み換えタンパク FGF-2 (rhFGF-2; 5 ng/mL)を作用させると、FGFR1・Akt・Erk が活性化し、FGFR 阻害剤 SU5402 (50 μ M) の処理によりそれらのシグナルは有意に阻害された。さらに rhFGF-2 の刺激で細胞生存・遊走が促進され、SU5402 の作用によりそれらは有意に阻害された。

4. ヒト食道扁平上皮癌における腫瘍間質の FGF-2 発現は、悪性度および M2MΦ の浸潤数と相関する。

癌細胞における自己分泌メカニズムを確認するため、TE-9 に rhFGF-2 (20 ng/mL) を作用させると、主として Erk の活性化を介して生存・遊走が促進された。さらに蛍光免疫組織学的解析によって、FGF-2 陽性 CD204 陽性 MΦ の存在が確認されたため、切除標本 70 例を用いて TAM との関連も含めた FGF-2 の発現強度による臨床病理学的解析を行った。その結果、腫瘍間質における FGF-2 陽性細胞の浸潤数は深達度・血管浸潤・Stage が不良である症例との有意な相関が得られるとともに、M2MΦ マーカーである CD163 陽性 MΦ・CD204 陽性 MΦ の浸潤数とも有意な相関が得られた。

考察

本研究では、MΦ 様細胞に TECM を作用させることにより NCAM が誘導され、形態学的にも遊走能に関与する葉状仮足の部位に一致して NCAM の発現が認めれた。また NCAM をノックダウンすることで、TAM 様細胞での NCAM 発現が FGFR1 の発現および活性を制御することを見出した。

NCAM は非古典的な FGFR1 経路であり、FGFR1 との結合によりユビキチン系による分解が妨げられ、PI3K-Akt・Erk のような FGFR1 シグナル活性が維持される。FGFR1 の主要なリガンドである FGF-2 は古典的な FGFR1 経路である。非古典的 FGFR1 経路との相違はユビキチン系による FGFR1 の分解作用が生じる点にあるとされているが、NCAM および FGF-2 を介した FGFR1 シグナルの関連性については依然不明な点が多い。FGF-2 は Erk を介して内皮細胞の走化性や増殖を促進する作用を有するとともに、自己分泌・傍分泌・自己分泌作用の促進によって FGFR1 シグナルの活性化を起こすことが様々な腫瘍で報告されている。本研究では、TAM 様細胞においても rhFGF-2 の刺激で Erk を主体とした FGFR1 シグナルが活性化されることを確認した。TAM 様細胞において FGF-2 の分泌は認めなかったものの、蛍光免疫染色によって細胞質および核に FGF-2 と FGFR1 の発現所見が認められ、自己分泌作用による FGFR1 シグナル活性化機能を有する可能性が示唆された。

先行研究において、食道腺癌を含めた食道癌における FGF-2 の発現は不良な予後と相関する一方で、SCC に限れば予後との相関は認めないと報告されている。本研究では間質細胞における FGF-2 の発現を含めた SCC での解析を行い、FGF-2 の発現と予後との相関は得られなかったものの、腫瘍間質での FGF-2 発現が様々な不良な病理学的因子と有意に相関することを見出し、腫瘍微小環境における FGF-2 の発現が ESCC の進展に関与する可能性を示唆した。

結語

本研究により、ESCC 微小環境における TAM での NCAM 発現は、TAM 自身の FGFR1 発現および活性化を制御するとともに、FGF-2 を介した FGFR1 シグナルの活性化によっても TAM ならびに癌細胞の生存・遊走が促進されることを明らかとした。以上より、これらの分子を用いた新規分子標的治療の開発、および新規の予後予測バイオマーカーが ESCC の治療に有用である可能性が示唆された。